

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 00/75341 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/53,  
9/02, 15/82, 1/19, C12P 7/64, C12Q 1/68, C11C 1/00,  
A01H 5/00

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-  
SELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05274

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 25 718.3 7. Juni 1999 (07.06.1999) DE  
199 62 409.7 22. Dezember 1999 (22.12.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): HEINZ, Ernst  
[DE/DE]; Ohnhorststrasse 18, D-22609 Hamburg (DE).  
STYMNE, Sten [SE/SE]; Torrlösa 1380, S-269 90 Sval-  
oev (SE). LEE, Michael [NZ/SE]; Herman Ehles Väg 2-4,  
S-268 31 Svaloev (SE). GIRKE, Thomas [DE/US]; 16945  
Vinaruz Place, San Diego, CA 92128 (US). SPERLING,  
Petra [DE/DE]; Grindelallee 45, D-20146 Hamburg (DE).  
ZAEHRINGER, Ulrich [DE/DE]; Parkallee 22, D-23845  
Borstel (DE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title:  $\Delta 6$ -ACETYLENASE AND  $\Delta 6$ -DESATURASE FROM CERATODON PURPUREUS

(54) Bezeichnung:  $\Delta 6$ -ACETYLENASE UND  $\Delta 6$ -DESATURASE AUS CERATODON PURPUREUS

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing unsaturated fatty acids and to a method for preparing triglycerides with an increased unsaturated fatty acid content. The invention also relates to the utilization of DNA sequences coding for  $\Delta 6$ -acetylenase/ $\Delta 6$ -desaturases or  $\Delta 6$ -desaturases for producing a transgenic organism, preferably a transgenic plant or a transgenic microorganism with an increased fatty acid, oil or lipid or content with  $\Delta 6$ -triple bonds and/or  $\Delta 6$ -double bonds.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von DNA Sequenzen codierend für  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturasen bzw.  $\Delta 6$ -Desaturasen zur Herstellung eines transgenen Organismus, bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta 6$ -Dreifachbindungen und/oder  $\Delta 6$ -Doppelbindungen.

WO 00/75341 A1

UP



$\Delta 6$ -Acetylenase und  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von

- 10 DNA Sequenzen codierend für  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturasen bzw.  $\Delta 6$ -Desaturasen zur Herstellung eines transgenen Organismuses bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta 6$ -Dreifachbindungen und/oder  $\Delta 6$ -Doppelbindungen.

15

Außerdem betrifft die Erfindung eine isolierte Nukleinsäuresequenz; eine Expressionskassette enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Außerdem be-

- 20 trifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

- Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden
- 30 beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie *Mortierella* oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnenblume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form
- 35 ihrer Triacylglyceride anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt.

- Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, da sie einen positiven Einfluß auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit einer Herzerkrankung haben. Sie finden in verschiedenen diätischen
- 45 Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geänderten

5 Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine  $\Delta$ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine  $\Delta$ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine  $\Delta$ -12-Desaturase beansprucht.  $\Delta$ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022 und

10 WO 99/27111 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. In

15 WO 96/13591 wird eine  $\Delta$ -6-Palmitoyl-ACP-Desaturase beschrieben und beansprucht. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al.,

20 Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792).

In WO 97/37033 wird eine  $\Delta$ -12-Acetylenase beschrieben. Durch dieses Enzym lassen sich ungesättigte  $C_{18}$ -Fettsäuren mit einer Dreifachbindung herstellen. Derartige Fettsäuren können neben der

25 Anwendung in Nahrungsmittel aufgrund ihrer Reaktivität auch zur Herstellung von Polymeren verwendet werden. Sperling et al. berichtete auf einer Tagung (South Lake Tahoe, Canada, June 9 - 13, 1999) über die Klonierung eines Enzyms, das ebenfalls Dreifachbindungen in Fettsäuren einführt. Wobei sich die Substrate dieses

30 Enzyms von denen der  $\Delta$ -12-Acetylenase unterscheiden und die Dreifachbindung an anderer Position durch das Enzym in die Fettsäuren eingeführt wird.

In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums

35 zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611-614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg.

40 Eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich aber, daß die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen.

- 5 Es bestand daher die Aufgabe weitere Enzyme für die Synthese ungesättigter konjugierter Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde durch eine isolierte Nukleinsäuresequenz gelöst, die für ein Polypeptid mit  $\Delta^6$ -Acetylenase- und/oder
- 10  $\Delta^6$ -Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
  - 15 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
  - 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 75 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Poly-
  - 25 peptide wesentlich reduziert ist.

- Unter Derivate(n) sind beispielsweise funktionelle Homologe der von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 kodierten Enzyme oder deren enzymatischer Aktivität, das heißt Enzyme, die
- 30 dieselben enzymatischen Reaktionen wie die von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 kodierten Enzyme katalysieren, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls eine vorteilhafte Herstellung von ungesättigten Fettsäuren mit Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen in  $\Delta^6$ -Position. Unter ungesättigten
- 35 Fettsäuren sind im folgenden einfach oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen aufweisen, zu verstehen. Die Dreifach- und/oder Doppelbindungen können konjugiert oder nicht konjugiert sein. Die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten
- 40 Sequenzen kodieren für ein neue Enzyme, die eine Acetylenase- und/oder  $\Delta^6$ -Desaturase-Aktivität aufweisen.

- Das erfindungsgemäße Enzym  $\Delta^6$ -Acetylenase/ $\Delta^6$ -Desaturase führt vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden eine *cis*-Doppel-
- 45 bindung in Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> ein und/oder konvertiert eine bereits vorhandene *cis*-Doppelbindung in Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> in eine Dreifachbindung (siehe SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3). Das Enzym hat

außerdem eine  $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität, die vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden ausschließlich eine *cis*-Doppelbindung in Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> einführt. Diese Aktivität hat auch das Enzym mit der in SEQ ID NO: 11 genannten Sequenz. Bei dem es  
5 sich um eine monofunktionelle  $\Delta 6$ -Desaturase handelt.

Die erfindungsgemäße(n) Nukleinsäuresequenz(en) (für die Anmeldung soll der singular den plural umfassen und umgekehrt) oder Fragmente davon können vorteilhaft zur Isolierung weiterer  
10 genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.

Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen Organismen eukaryontischen Organismen wie Pflanzen wie speziell Moosen, Dinoflagellaten oder Pilze isolieren.

15

Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 70 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, vorteilhaft mindestens 75 % Homologie, bevorzugt mindestens 80 %  
20 Homologie, besonders bevorzugt mindestens 85 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie aufweisen. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäurebereich berechnet. Es wurde das Programm PileUp, BESTFIT, GAP, TRANSLATE bzw. BACKTRANSLATE  
25 (= Bestandteil des Programmpaketes UWGCG, Wisconsin Package, Version 10.0-UNIX, January 1999, Genetics Computer Group, Inc., Deverux et al., Nucleic. Acid Res., 12, 1984: 387-395) verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153). Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleitete  
30 Aminosäuresequenzen sind Sequenz SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 12 zu entnehmen. Unter Homologie ist Identität zu verstehen, das heißt die Aminosäuresequenzen sind zu mindestens 70 % identisch. Die erfindungsgemäßen Sequenzen sind auf Nukleinsäureebene mindestens 65 % Homolog, bevorzugt mindestens 70 %, besonders bevorzugt 75 %, ganz besonders bevorzugt mindesten 80 %.  
35

Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der  
40 abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.

Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 beschriebenen DNA-Sequenzen oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise  
45 mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten wie beispielsweise den oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standard-

- bedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Acetylenase- und/oder Desaturasegenen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Vorteilhaft werden die Histidin-Box-Sequenzen verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.
- Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID No: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden

und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

- Außerdem sind unter Homologen der Sequenzen SEQ ID NO: 1,
- 5 SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren
- 10 können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

- Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen,
- 15 deren Nukleotidsequenz im Bereich -1 bis -2000 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.

- 20 Unter Derivaten sind auch die Antisense-DNAs zu verstehen, die zur Hemmung der Proteinbiosynthese der erfindungsgemäßen Proteine verwendet werden können. Diese Antisense-DNAs gehören zu den erfindungsgemäßen nichtfunktionellen Derivaten, wie Derivate, die
- 25 keine enzymatische Aktivität aufweisen. Weitere dem Fachmann bekannte Methoden der Herstellung von nichtfunktionellen Derivaten sind die sogenannte Cosuppression, die Verwendung von Ribozymen und Introns. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die Einzelstrang Nukleinsäuren wie mRNA, zu
- 30 denen sie eine Komplementarität aufweisen, schneiden können. Dadurch können mit Hilfe dieser Ribozyme (Haselhoff and Gerlach, Nature, 334, 1988: 585-591) mRNA-Transkripte katalytisch gespalten werden und so die Translation dieser mRNA unterdrückt werden. Derartige Ribozyme können speziell auf ihre Aufgaben hin
- 35 zugeschnitten werden (US 4,987,071; US 5,116,742 und Bartel et al., Science 261, 1993: 1411-1418). Mit Hilfe der Antisense-DNA können dadurch Fettsäuren, Lipide oder Öle mit einem erhöhten Anteil an gesättigten Fettsäuren hergestellt werden.
- 40 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase kodieren, können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen  $\Delta 6$ -Acetylenase/
- 45  $\Delta 6$ -Desaturase und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von den entsprechenden



Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzen bevorzugt werden. Dies führt in der Regel zu einer optimalen Expression der heterologen Gene. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Ein Beispiel für *Corynebacterium glutamicum* ist gegeben in: Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Die Durchführung solcher Experimente sind mit Hilfe von Standardmethoden durchführbar und sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.

10

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für das  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen kodieren, sind solche Derivate der erfindungsgemäßen Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen, das heißt die enzymatische Aktivität der Proteine besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Codon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

20

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Gehaltes von  $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder  $\Delta 6$ -Doppelbindungen in Fettsäuren, Ölen oder Lipiden in der Pflanze durch Überexpression des  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Mögliche Techniken zur in vitro-Evolution von DNA zur Veränderung bzw. Verbesserung der DNA-Sequenzen sind beschrieben bei Patten, P.A. et al., *Current Opinion in Biotechnology* 8, 724-733 (1997) oder bei Moore, J.C. et al., *Journal of Molecular Biology* 272, 336-347 (1997). Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten werden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität

- sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative
- 5 Proteinsequenz, wie z.B. ein Signalsequenz für das ER, das das  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

- Vorteilhaft können die  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- bzw.
- 10  $\Delta 6$ -Desaturase-Gene im erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden. Beispiele für derartige Gene sind die Acetyltransferasen, weitere Desaturasen oder Elongasen. Für die in-vivo und speziell in-vitro Synthese ist die Kombination mit z.B. NADH-Cytochrom B5 Reduktasen
- 15 vorteilhaft, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.

- Unter den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen sind Proteine zu verstehen, die eine in den Sequenzen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4
- 20 oder SEQ ID NO: 12 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz enthalten, wobei die enzymatische Aktivität des in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Proteins erhalten
- 25 bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physiko-
- 30 chemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge ver-
- 35 tauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden.

- Unter Derivaten sind auch funktionelle Äquivalente zu verstehen, die insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer
- 40 ursprünglich isolierten für eine  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase codierende Sequenz beinhalten, welche weiterhin die gewünschte Funktion, das heißt deren enzymatische Aktivität nicht wesentlich reduziert ist, zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen
- 45 oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der

Δ6-Acetylenase/Δ6-Desaturase- und/oder Δ6-Desaturase Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt (= nicht wesentlich reduziert) oder verstärkt ist  
10 (= Enzymaktivität stärker als die Aktivität des Ausgangsenzym, das heißt Aktivität ist höher als 100 %, bevorzugt höher als 110 %, besonders bevorzugt höher als 130 %).

Die Nukleinsäuresequenz kann dabei vorteilhaft beispielsweise  
15 eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine erfindungsgemäßen Expressionskassette geeignete codierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine Δ6-Acetylenase/Δ6-Desaturase und/oder Δ6-Desaturase mit den oben beschriebenen Sequenzen kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Über-  
20 produktion von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen in Δ6-Position verleihen. Diese Sequenzen können homologen oder heterologen Ursprungs sein.

Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) sind die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Gen-  
25 expression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion  
30 exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche  
40 Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch  
45 einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regu-

- lationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor
- 5 das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-
- 10 Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die  $\Delta 6$ -Acetylenase-/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.
- 15 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der
- 20 Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 25 Als Promotoren in der Expressionskassette sind grundsätzlich alle Promotoren geeignet, die die Expression von Fremdgenen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen oder Pilzen steuern können. Vorzugsweise verwendet man insbesondere ein pflanzliche Promotoren oder Promotoren, die aus einem Pflanzenvirus entstammen. Vorteilhaft
- 30 Regulationsequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI<sup>q</sup>-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -P<sub>R</sub>- oder im  $\lambda$ -P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationsequenzen sind beispielsweise in den
- 35 gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF $\alpha$ , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren wie CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], SSU, OCS, lib4, STLS1, B33, nos (= Nopalinsynthase Promotor) oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Die
- 40 Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen  $\Delta 6$ -ACETYLENASE/ $\Delta 6$ -DESATURASE- und/oder  $\Delta 6$ -DESATURASE-Gens in den Organismen vorteilhaft in den Pflanzen zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige vorteilhafte Pflanzen-
- 45 promotoren sind beispielsweise der PRP1-Promotor [Ward et al., Plant.Mol. Biol.22(1993), 361-366], ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer

(Gatz et al., (1992) Plant J. 2,397-404), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO93/21334) Promotor. Weitere Pflanzen-  
 5 promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FB Pase aus Kartoffel, der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-  
 10 spezifischen Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen/-organen sicherstellen, in denen die Fettsäurebiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet wie beispielsweise im Endosperm  
 15 oder im sich entwickelnden Embryo. Insbesondere zu nennen sind vorteilhafte Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der USP-Promotor oder Derivate davon, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor. Der besonders vorteilhafte USP-Promotor oder dessen  
 20 Derivate vermitteln in der Samenentwicklung eine sehr früh Genexpression (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67). Weitere vorteilhafte samenspezifische Promotoren, die für monokotyle und dikotyle Pflanzen verwendet werden können, sind die für Dikotyle geeignete Promotoren wie der Napingen-Promotor aus Raps (US5,608,152), der Oleosin-Promotor aus  
 25 Arabidopsis (WO98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO91/13980) oder der Leguminosen B4-Promotor (LeB4, Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239) oder für Monokotyle geeignete Promotoren wie die Promotoren des lpt2-  
 30 oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230) oder die Promotoren des Gersten Hordein-Gens, des Reis Glutelin-Gens, des Reis Oryzin-Gens, des Reis Prolamin-Gens, des Weizen Gliadin-Gens, des Weizen Glutelin-Gens, des Mais Zein-Gens, des Hafer Glutelin-Gens, des Sorghum Kasirin-Gens oder des Roggen Secalin-  
 35 Gens, die in WO99/16890 beschrieben werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen und  
 40 Lipiden bzw. deren Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor des Napin-Gens aus Raps (US 5,608,152), des USP-Promotor aus Vicia faba (USP=unbekanntes Samenprotein, Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):  
 45 459-67), des Oleosin-Gens aus Arabidopsis (WO98/45461), des Phaseolin-Promotors (US 5,504,200) oder der Promotor des Legumin B4-Gens (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):

233-9). Weiterhin sind zu nennen Promotoren, wie der des lpt2 oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230), die in mono-otylen Pflanzen samenspezifische Expression vermitteln.

- 5 In der Expressionskassette (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die Gene der  $\Delta 6$ -ACETYLENASE/ $\Delta 6$ -DESATURASE-  
10 und/oder  $\Delta 6$ -DESATURASE liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die  $\Delta 15$ -,  $\Delta 12$ -,  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ -Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen, die  
15  $\Delta 12$ -Acetylenase, die Acyl-ACP-Thioesterasen,  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthasen oder  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Reductasen genannt. Vorteilhaft werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet.

- Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren  
20 Regulationssequenzen wie die oben genannten für die erfindungsgemäße Expressionskassette und das erfindungsgemäße Verfahren, wie unten beschrieben, verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

- 25 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente (= erfindungsgemäße Nukleinsäuren)  
30 miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder  
35 Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp,  
40 häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus beispielsweise zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz, die für ein  $\Delta 6$ -Acetylenase/  
45  $\Delta 6$ -Desaturase und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codiert und eine Region

für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, -primer-repair-, Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, -chewing-back- oder Auffüllen von Überhängen für -bluntends-, können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

15 Von Bedeutung für eine vorteilhafte hohe Expression kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicher-  
20 licherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen  
25 T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J.3 (1984), 835 ff) oder entsprechende funktionelle Äquivalente.

30 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-DNA-Sequenz sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und  
35 Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory,  
40 Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene  
45 DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die

Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein D6-Acetylenase/Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- Die DNA Sequenz codierend für eine  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus* beinhaltet alle Sequenzmerkmale, die notwendig sind, um eine dem Ort der Fettsäure-, Lipid- oder Ölbiosynthese korrekte Lokalisation zu erreichen. Daher sind keine weiteren Targetingsequenzen per se notwendig. Allerdings kann eine solche Lokalisation wünschenswert



und vorteilhaft sein und daher künstlich verändert oder verstärkt werden, sodaß auch solche Fusionskonstrukte eine bevorzugte vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sind.

- 5 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in Plastiden gewährleisten. Unter bestimmten Umständen kann auch ein Targeting in andere Kompartimente (referiert: Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423) z.B. in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER),
- 10 Peroxisomen, Lipidkörper oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen ein Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, wünschenswert sein.

- Vorteilhafterweise werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-
- 15 sequenzen zusammen mit mindestens einem Reportergen in eine Expressionskassette kloniert, die in den Organismus über einen Vektor oder direkt in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenz-
- 20 assay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielsweise seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen, das  $\beta$ -Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-
- 25 phosphat-Phosphatasegen, das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen,  $\beta$ -Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Meßbarkeit und Quantifizier-
- 30 barkeit der Transcriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressions-
- 35 kassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz für die  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase DNA se-
- 40 quenz operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen
- 45 kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation in Plastiden. Aber auch Targeting-Sequenzen zur Gewähr-

leistung der subzellulären Lokalisation im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (= ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten sind bei Bedarf einsetzbar sowie Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-  
 5 Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den USP- oder Napin-Promotor), das zu  
 10 exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Die Expressionskassette wird zur Expression in einem prokaryon-  
 15 tischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus beispielsweise einem Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirtsorganismus ermöglicht. Geeignete Plasmide sind  
 20 beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, pBR-Serie wie z.B. pBR322, pUC-Serie wie pUC18 oder pUC19, M13mp-Serie, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11 oder pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium  
 25 pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, weitere vorteilhafte Pilzvektoren werden von Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8: 423-488] und von van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi] sowie in More  
 30 Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego] und in "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge] beschrieben. Vorteilhafte Hefe-  
 35 promotoren sind beispielsweise 2 $\mu$ M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23. Beispiele für Algen- oder Pflanzenpromotoren sind pLGV23, pGHIac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 (siehe Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988). Die oben genannten Vektoren oder  
 40 Derivate der vorstehend genannten Vektoren stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISEN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods  
 45 in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben. Vorteilhafte Vektoren sind sog.

shuttle-Vektoren oder binäre Vektoren, die in E. coli und Agrobacterium replizieren.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Expressionskassette auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus der Expressionskassette als Vektor oder den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bestehen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassette.

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden. Fig. 1 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-mit 35S-Promotor (C) bzw. pBin-USP mit dem USP-Promotor (D). Die Ausgangsvektoren sind in Fig. 1 A) und B) dargestellt.

Alternativ kann ein rekombinanter Vektor (= Expressionsvektor) auch in-vitro transkribiert und translatiert werden, z.B. durch Nutzung des T7 Promotors und der T7 RNA Polymerase.

In Prokaryoten verwendete Expressionsvektoren nutzen häufig induzierbare Systeme mit und ohne Fusionsproteinen bzw Fusions-oligopeptiden, wobei diese Fusionen sowohl N-terminal als auch C-terminal oder anderen nutzbaren Domänen eines Proteins erfolgen können. Solche Fusionsvektoren dienen in der Regel dazu: i.) die Expressionsrate der RNA zu erhöhen ii.) die erzielbare Proteinsyntheserate zu erhöhen, iii.) die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen, iv.) oder die Reinigung durch einen für die Affinitätschromatographie nutzbare Bindesequenz zu vereinfachen. Häufig werden auch proteolytische Spaltstellen über Fusionsproteine eingeführt, was die Abspaltung eines Teils des Fusionsproteins auch der Reinigung ermöglicht. Solche Erkennungssequenzen für Proteasen erkennen sind z.B. Faktor Xa, Thrombin und Entero-kinase.

Typische vorteilhafte Fusions- und Expressionsvektoren sind pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A.

Weitere Beispiele für E. coli Expressionsvektoren sind pTrc [Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315] und pET Vektoren [Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, Amsterdam, Niederlande].

Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123), and pYES-Derivate (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf 9 Zellen. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich in Becker, D., et al. (1992)

"New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

5

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 oder Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:

- 10 187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cyto-megalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.  
15 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, der Expressionskassette oder des Vektors in Organismen beispiels-  
20 weise in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

- Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning:*  
25 *A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., *DNA Cloning* Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory  
30 Press oder Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, *Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press entnehmen.

- Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen  
35 Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte  
40 particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering  
45 and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise

wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Mit einem solchen Vektor transformierte *Agrobakterien* können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte *Agrobakterien* können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie *Arabidopsis* oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure, die Expressionskassette oder den Vektor eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind.

Beispielhaft seien Pflanzen wie *Arabidopsis*, Asteraceae wie *Calendula* oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Cyanobakterien, Ciliaten, Algen oder

- Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptocodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, Calendula, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, Calendula oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*.
- 10 Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).
- 15 Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen codierend für ein  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Ziel der Verwendung
- 25 ist die Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit erhöhtem Gehalt an Dreifachbindungen und Doppelbindung in  $\Delta 6$ -Position.
- Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression des
- 30  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens spezifisch in den Blättern, in den Samen, den Knollen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche Fettsäuren, Öle oder Lipide mit  $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder  $\Delta 6$ -Doppelbindungen überproduzierenden transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie
- 35 deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Gegenstand sind transgene Pflanze enthaltend eine erfindungsgemäße funktionelle oder nicht funktionelle (= Antisense-DNA oder enzymatische inaktives Enzym) Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle oder nicht funktionelle
- 40 Expressionskassette.
- Die Expressionskassette oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthaltend eine  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturasegenesequenz kann darüber hinaus auch zur Transformation der oben beispielhaft genannten Organismen wie Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen, Ciliaten

und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder  $\Delta 6$ -Doppelbindungen eingesetzt werden.

- 5 Erhöhung des Gehaltes von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder  $\Delta 6$ -Doppelbindungen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder
- 10  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in den erfindungsgemäßen Organismen vorteilhaft in den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen gegenüber den nicht gentechnisch modifizierten Ausgangspflanzen zumindest für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.
- 15 Der Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden beispielsweise ist im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so daß eine samenspezifische Expression des  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder
- 20 Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.
- 25 Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.
- 30 Die Wirksamkeit der Expression des Transgens  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens und deren Auswirkung
- 35 auf die Fettsäure-, Öl- oder Lipidbiosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend eine
- 40  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais, Soja, Reis, Baum-
- 45 wolle, Zuckerrübe, Raps und Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.



Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung sind wie oben  
5 beschriebenen transgene Pflanzen, die eine funktionelle oder nicht funktionelle erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle oder nicht funktionelle erfindungsgemäße Expressionskassette enthalten. Unter nicht funktionell ist zu verstehen, daß kein enzymatisch aktives Protein mehr syn-  
10 thetisiert wird. Außerdem ist unter nicht funktionellen Nukleinsäuren oder Nukleinsäurekonstrukten auch eine sogenannte Antisense-DNA zu verstehen, die zu transgenen Pflanzen führt, die eine Reduktion der enzymatischen Aktivität oder keine enzy-  
15 matischen Aktivität aufweisen. Mit Hilfe der Antisense-Technik, speziell wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz mit anderen Fettsäuresynthesegenen in der Antisense-DNA kombiniert wird, ist es möglich Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren bzw. gesättigte Fettsäuren zu synthetisieren. Unter  
20 Kulturen auf Festmedien oder in Flüssigkultur, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu verstehen.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 25 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA'-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder  
30 Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung einer  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturase-DNA-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem  
35 Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Dreifachbindungen oder delta-6-Doppelbindungen durch Expression dieser  $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 8 dargestellte Aminosäuresequenz.  
40
- Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 10 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 45 - Verwendung der Proteine mit den Sequenzen SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 10 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein erfindungsgemäßes

5 Nukleinsäurekonstrukt in einen bevorzugt Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt. Diese ungesättigten Fettsäuren enthalten vorteilhaft  $\Delta^6$ -Dreifach- und/oder  $\Delta^6$ -Doppelbindungen. Die Fett-

10 säuren können aus den Ölen bzw. Lipiden beispielsweise über eine basische Hydrolyse z.B. mit NaOH oder KOH freigesetzt werden.

Auch ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekenn-

15 zeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens eine erfindungsgemäße Expressionskassette in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert, gehört zu den Erfindungsgegenständen.

20

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, indem man Triglyceride mit gesättigten oder ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit

25 mindestens einem der Protein, das durch eine der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 oder SEQ ID NO: 11 kodiert wird, inkubiert. Vorteilhaft wird das Verfahren in Gegenwart von Verbindungen durchgeführt, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können. Anschließend

30 können die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

35 Die oben genannten Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit  $\Delta^6$ -Dreifach- und/oder  $\Delta^6$ -Doppelbindungen.

Mit Hilfe der sogenannten Antisense-Technologie können in einem

40 Verfahren auch Fettsäuren oder Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren hergestellt werden.

Als Organismen für die genannten Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais,

45 Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Raps und Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Alfalfa, Erdnuß, Rizinus, Kokosnuß, Ölpalme,

- Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Cyanobakterien, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie
- 5 Dinoflagellaten wie *Cryptothecodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Mikroorganismen wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, Calendula, Erdnuß, Kakao-
- 10 bohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, *Carthamus* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

- Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirts-
- 15 organismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden
- 20 oder nicht. Die Anzucht kann batch wise, semi batch wise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden.
- 30 Pflanzen werden nach Transformation zunächst wie oben beschrieben regeneriert und anschließend wie üblich angezüchtet bzw. angebaut.

- Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicher-
- 35 weise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei
- 40 Temperaturen zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 20°C bis 50°C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Überschuß an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuß von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation entfernt.
- 45 Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO<sub>2</sub> erfolgen. Nach

Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden.

Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit polaren Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über Säulen ist möglich.

- 10 Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese in üblicherweise verseift.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, die nach den oben genannten Verfahren hergestellt wurden, sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika. Hierzu werden diese den Nahrungsmitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt.

20

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

- 25 Beispiel 1:

Allgemeine Klonierungsverfahren:

Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2:

- 40 Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

## Beispiel 3:

Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

5

- Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen wurden binäre Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 oder *Escherichia coli* genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nor-  
10 deutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten *Agrobacterien*kolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter  
15 steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petri-schale mit einer 1:50 *Agrobakterien*verdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Konkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit weiter-  
20 geführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 mikrom Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten  
25 sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstums-hormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln zum Medium gegeben.

## Beispiel 4:

30 Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

- Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Var. Columbia Col 0 (Lehle Seeds, Round Rock, Texas, USA) erfolgte mittels Blüten-infiltrationsmethode wie beschrieben bei: Bechtold, N., Ellis, J.  
35 and Pelletier, G. in Planta, *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316 (1993), 1194-119 oder mittels Wurzeltransformationsmethode.

## 40 Beispiel 5:

- Die Transformation von Maispflanzen erfolgte wie bei Paredy, D., Petolino, J., Skokut, T., Hopkins, N., Miller, M., Welter, M., Smith, K., Clayton, D., Pescitelli, S., Gould, A., Maize Trans-  
45 formation via Helium Blasting. Maydica. 42(2): 143-154, 1997, beschrieben.

## Beispiel 6:

Isolierung und Klonierung der  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

5

Um DNA-Sequenzen aus *Ceratodon purpureus* zu isolieren, die für eine  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und eine  $\Delta 6$ -Desaturase kodieren, wurden verschiedene degenerierte Oligonukleotidprimer von DNA-Sequenzen abgeleitet, die für  $\Delta 5$ - (EMBL Accession-Nr. Z81122) und  
10  $\Delta 6$ -Fettsäure-Desaturasen (U79010, AJ222980, AF031477 kodieren:

Primer A: 5'-TGG TGG AA(A/G) TGG A(A/C)I CA(C/T) AA-3'  
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz  
WWKW(N/T/K)H(N/K)

15

Primer B: 5'-(T/G)GI TGG AA(A/G) (T/G)(G/A)I (A/C)AI CA(C/T)  
AA-3'  
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz  
(G/W)WK(E/D/W)(N/Q/K)H(N/K)

20

Primer C: 5'-AT (A/T/G/C)T(T/G) (A/T/G/C)GG (A/G)AA (A/T/  
G/C)A(A/G) (A/G)TG (A/G)TG -3', reverse primer, abge-  
leitet von der Aminosäuresequenz (I/M)(H/Q/N)PF(L/F)HH

25 Mittels Polymerasekettenreaction (PCR) mit Einzelstrang-cDNA aus *C. purpureus* wurden mit Primer A und Primer C zwei DNA-Fragmente von 557 bp (Cer3) und 575 bp (Cer16) Länge und mit Primer B und Primer C ein DNA-Fragment von 560 bp (Cer1) Länge amplifiziert. Es wurde folgendes Programm für die Amplifizierung benutzt:

30 10 min bei 94°C, Pause für 'hot start' bei 72°C, gefolgt von 32 Zyklen von 20 s bei 94°C, 1 min bei 45°C (Bindungstemperatur,  $T_m$ ) und 1 min bei 72°C, 1 Zyklus von 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C. Für die Amplifikation wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet.

35

Die oben genannten doppelsträngigen DNA-Fragmente aus den zwei PCR-Amplifikationen wurden in den pGEM-T Vektor (Promega) legiert, in *E. coli* XL1blue MRF' Kan (Stratagene) transformiert und mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready  
40 Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) sequenziert. Die DNA-Teilsequenzen von Cer1 und Cer3 zeigten 70 % Identität. Die oben genannten DNA-Teilsequenzen kodierten ohne Primer für offene Leserahmen bei Cer1 von 173 Aminosäuren (SEQ ID NO: 5 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer1 und SEQ ID NO: 6 =  
45 Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer1), bei Cer 3 von 172 Aminosäuren (SEQ ID NO: 7 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer3 und SEQ ID NO: 8 = Partielle deduzierte Amino-

säuresequenz von Cer3) und bei Cer16 von 178 Aminosäuren (SEQ ID NO: 9 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer16 und SEQ ID NO: 10 = Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer16). Die abgeleitete Proteinsequenz von Cer1 wies 64 % zu Cer3 und 28 % identische Aminosäuren zu Cer16 auf; Cer 3 und Cer16 wiesen wiederum 27 % identische Aminosäuren auf.

Die höchste Ähnlichkeit der Cer1- und Cer3-Proteine besteht zu der  $\Delta 6$ -Acyl lipid-Desaturase aus *Physcomitrella patens* (Girke et al., Plant J., 15, 1998: 39-48), während Cer16 die höchste Ähnlichkeit zu der  $\Delta 6$ -Acyl lipid-Desaturase und der  $\Delta 8$ -Sphingolipid-Desaturase aus höheren Pflanzen aufweist.

Eine gerichtete  $\lambda$ ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* wurde von Fritz Thummler, Botanisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt (Pasentsis et al., Plant J., 13, 1, 1998: 51-61). Es wurde ein PCR-Test dieser *Ceratodon*-Bank durchgeführt, bei dem spezifische Primer von den oben genannten DNA-Teilsequenzen Cer1, Cer3 und Cer16 abgeleitet wurden:

Spezifische forward und reverse Primer:

Cer1: 5'-CGAATGAGTGCGACGAAC -3' + 5'-AATAACCTGGGCTCTCAC-3'  
 Cer3: 5'-ATGAGGATATTGATACTCTC-3' + 5'-GCAATCTGGGCATTACACG-3'  
 25 Cer16: 5'-GACATCAAAGCTCTTCTC-3' + 5'-GGCGATGAGAAGTGGTTC-3'

Eine Restriktionsanalyse (Hind III bzw. EcoR V) der aus der cDNA-Bank mittels PCR amplifizierten Produkte zeigte in allen drei Fällen das gleiche Restriktionsmuster wie das der PCR-Amplifikate aus der ss-cDNA, d.h. die *Ceratodon*-cDNA-Bank enthält die drei Klone Cer1, Cer3 und Cer16.

Beispiel 7:

35 cDNA-Bank Screening und Sequenzierung der "full length" Klone

DNA-Minipräparationen, der drei aus ss-cDNA amplifizierten PCR-Fragmente Cer1, Cer3, Cer16 von ~570 bp Länge in pGEM-T (siehe Beispiel 6) wurden für das weitere Screening der vollständigen Klone aus einer  $\lambda$  ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* an M. Lee und S. Stymne abgegeben. Dieses cDNA-Bank-Screening führte bisher zu zwei vollständigen Klonen von Cer1 und Cer3 mit Inserts von ca. 2,2 kb, die als EcoR I / Kpn I-Fragmente aus dem  $\lambda$  ZAP-Vektor in die EcoR I / Kpn I-Schnittstellen des puc19-Vektors (New England Biolabs) subkloniert und in *E. coli* JM105 transformiert wurden.

Ein weiteres Screening der cDNA-Bank mit Cer1 und Cer3 als Hybridisierungsproben unter niedriger Stringenz zeigte, daß mindestens ein weiterer Cer1-homologer Klon existiert, der evtl. für die  $\Delta 5$ -Desaturase kodieren könnte.

- 5  
Zwei *E. coli*-Klone, Cer1-50 und Cer3-50, wurden vollständig sequenziert. Cer1-50 hat eine Länge von 2003 bp (SEQ ID NO: 1 = Nukleotidsequenz der  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus* mit 5'- und 3'-untranslatierten Regionen und polyA)
- 10 und kodiert für ein offenes Leseraster von 483 Aminosäuren (SEQ ID NO: 2 = deduzierte Aminosäuresequenz der  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*). Cer3-50 besitzt eine Länge von 2142 bp (SEQ ID NO: 11 = Nukleotidsequenz [2142 bp] der  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus* mit 5'- und 3'-untrans-
- 15 latierten Regionen) mit einem offenen Leserahmen von 520 Aminosäuren (SEQ ID NO: 12 = deduzierte Aminosäuresequenz der  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*). Beide Proteinsequenzen weisen N-terminal das hochkonservierte HPGG-Motiv des Cytochrom  $b_5$  auf (Lederer F., Biochimie 76, 1994: 674-692) und C-terminal
- 20 die für Desaturasen charakteristischen drei Histidin-Boxen auf (Shanklin et al., Biochemistry, 33, 1994: 12787-12794). Sie stellen somit weitere Mitglieder der wachsenden Familie der Cytochrom  $b_5$ -Fusionsproteine dar (Napier et al., Trends in Plant Science, 4, 1, 1999: 2-4). Das erste Histidin der dritten Box
- 25 ist gegen Glutamin ausgetauscht, einem weiteren Charakteristikum von  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Acyl lipid-Desaturasen sowie  $\Delta 8$ -Sphingolipid-Desaturasen.

Beispiel 8:

- 30  
Klonierung der gesamten funktionellen aktiven  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und  $\Delta 6$ -Desaturase-Sequenz mittels PCR und die Bereitstellung dieser Sequenz für die Klonierung in Vektoren sowie funktionelle Expression in Hefe
- 35  
Es wurde eine cDNA hergestellt, die für Enzyme mit  $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität aus *Ceratodon purpureus* codiert. Analog zu dem hier beschriebenen Beispiel wurde die  $\Delta 6$ -Desaturase kloniert (siehe SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 bzw. SEQ ID NO: 12).
- 40  
Hierzu wird zunächst anhand der Cer1-cDNA für die  $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase aus *Ceratodon purpureus* die Oligonukleotide für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) abgeleitet.



Cer1: 5'- CC GGTACC **ATG** GCC CTC GTT ACC GAC-3' +  
 5'- CC GAATTC **TTA** GTG AGC GTG AAG CCG-3'

Cer3: 5'- CC GGTACC **ATG** GTG TCC CAG GGC GGC-3' +  
 5'- CC GAATTC **TCA** ACT CGC AGC AAG CTG-3'

Die folgenden Primer wurden abgeleitet von Cer1 für die Expression in Hefe angepaßt:

10 5'-Primer: 5'-AAAAGGATCCAAAATGGCCCTCGTTACCGAC-3'  
 3'-Primer: 5'-AAAAGTCGACTTAGTGAGCGTGAAGCC-3'

In einer PCR Reaktion wird eine D6-Acetylenase/Desaturase cDNA aus *Ceratodon purpureus* als Matrize verwendet. Mithilfe der  
 15 Primer wird eine BamHI-Restriktionsschnittstelle vor dem Start-codon der D6-Acetylenase/Desaturase cDNA eingeführt. Für eine gerichtete Klonierung wird hinter das Stopcodon eine SalI-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/micro l Matrizen DNA, 0,5 micro M der Oligo-  
 20 nukleotide und, 200 microM Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0,02 U/micro l Pwo Polymerase (Boehringer Mannheim) und werden in einer PCR-Maschine der Firma Perkin Elmer mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

25  
 Anlagerungstemperatur: 50°C, 52 sec  
 Denaturierungstemperatur: 95°C, 52 sec  
 Elongationstemperatur: 72°C, 90 sec  
 Anzahl der Zyklen: 30

30  
 Das erhaltene Fragment von 1467 Basenpaaren wird in den mit EcoRV gespaltenen Vektor pBluescript SK- (Stratagene) ligiert. Durch Kontrollspaltung wird ein Klon identifiziert pBS-Cer1, dessen Insert durch BamHI/SalI in voller Länge exzisierbar ist (1452  
 35 Basenpaare plus 15 Nukleotide Restriktionsschnittstellen) und folgende Sequenz aufweist (das Start- und Stopcodon ist unterstrichen, die Schnittstellen sind kursiv dargestellt). Analog kann auch eine cDNA Sequenz des Klones Cer50 genutzt werden. Dabei handelt es sich um eine monofunktionelle delta-6-Desaturase  
 40 (siehe SEQ ID NO: 3). Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 4 zu entnehmen.

Zur Überprüfung der Funktionalität des codierten Enzyms in einem Mikroorganismus, wird das 1467 bp BamHI/SalI-Fragment aus pBS-  
 45 Cer1 in den BamHI/XhoI geschnittenen Expressionsvector pYES2 (Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und Hefe nach Standardprotokollen mit dem neu entstandenen Plasmid pYES2-Cer1

transformiert (siehe Transformationsprotokoll Invitrogen, Groningen, Niederlande). Erhaltene Kolonien werden auf Raffinosehaltigen Medium angezogen und mittels Galaktose die Genexpression der D6-Acetylenase/Desaturase induziert (siehe unten).

5

Beispiel 9:

#### Lipidanalyse von transformierten Hefen

- 10 Hefen können neben den eigenen Fettsäuren (16:0, 16:1, 18:0 und 18:1) auch exogene Fettsäuren in ihre Membranlipide inkorporieren. Um die Substratspezifität der jeweils exprimierten Desaturase zu testen, wird dem CM - 2 % Raffinose-Medium zur Solubilisierung exogener Fettsäuren 1 % Tergitol NP-40 (w/v,
- 15 Sigma) und 0,003 % der entsprechenden Fettsäure (Stammlösung: 0,3 % bzw. 3 % Fettsäure in 5 % Tergitol NP-40, w/v) vor der Inokulation zugegeben. Die Vorkultur erfolgte durch Inokulation von 3 ml CM- 2 % Raffinose-Medium / 1 % Tergitol NP-40 mit einer transgenen Hefekolonie und anschließender Inkubation für 2 d bei
- 20 30°C im Roller bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 4,0 bis 4,3. Für die Hauptkultur werden 10 ml CM- 2 % Raffinose/1 % Tergitol NP-40-Medium  $\pm$  0,003 % Fettsäure mit einem Aliquot der Vorkultur (200 fache Verdünnung) ad  $OD_{600}$  0,02 angeimpft und 24 h bei 30°C, 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die
- 25 Induktion der Testkulturen erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  0,5 bis 0,6) durch Zugabe von Galaktose ad 1,8 %. Die Ernte der induzierten Zellen erfolgte nach weiteren 24 h aeroben Wachstums bei 30°C bei einer  $OD_{600}$  von 4,0 bis 4,3.
- 30 Die induzierten Hefezellen werden durch 10 min Zentrifugation bei 2000 g geerntet, in 3 ml Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C abgekocht und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide trans-
- 35 methyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrom-pack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei
- 40 240°C analysiert. Die Identität der Mono-, Di-, Tri- und Tetraensäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Für die Tri- und Tetraensäuren sind keine Referenzsubstanzen erhältlich. Ihre Identität und die Position der Dreifachbindung wird durch geeignete chemische
- 45 Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS von analysiert. Die GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus den transgenen Hefen, die

mit dem Leervektor pYES2, mit pYES2-Cer1 ( $\Delta 6$ -Acetylenase) transformiert werden, ist in Tab. 1 dargestellt. Die transgenen Hefezellen werden ohne exogenen Fettsäuren oder nach Zugabe von Linolsäure (18:2),  $\gamma$ -Linolensäure ( $\gamma$ -18:3),  $\alpha$ -Linolensäure (18:3) oder  $\omega 3$ -Octadecatetraensäure (18:4) analysiert.

Tabelle 1 gibt die GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus transgenen Hefen, die mit dem Leervektor pYES2, der  $\Delta 6$ -Acetylenase (Cer1/pYES2) und der  $\Delta 6$ -Desaturase (Cer3/pYES2) transformiert wurden, wieder. Die transgenen Hefezellen wurden ohne exogenen Fettsäuren ( - ) oder nach Zugabe von Linolsäure (18:2),  $\gamma$ -Linolensäure ( $\gamma$ -18:3),  $\alpha$ -Linolensäure ( $\alpha$ -18:3) oder  $\omega 3$ -Octadecatetraensäure (18:4) analysiert. Fettsäurezusammensetzung in [mol %] der Gesamtfettsäuren, wobei die Inkorporation der gefütterten Fettsäuren (schwarzer Fettdruck), die Desaturierungsprodukte (in roter Farbe) und die Summe der Desaturierungsprodukte (letzte Zeile) bei den einzelnen Fütterungsversuchen angegeben sind.

Beispiel 10:

Erzeugung transgener Pflanzen, welche ein Enzym mit  $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase-Aktivität überexprimieren.

Für die Transformation von Pflanzen wird ein Transformationsvektor erzeugt, der das BamHI/SalI-Fragment aus pBS-Cer1 in den mit BamHI/SalI gespaltenen Vektor pBin-USP oder in pBinAR ligiert wird. pBin-USP und pBinAR sind Derivate des Plasmides pBin19. pBinAR entstand aus pBin19, indem in pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711) ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment (entsprechend den Nukleotiden 6909-7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. (1980) Cell 21, 285) inseriert wird. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., (1984) EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749-11939 wird als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert. Es entstand das Plasmid pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 66, 221-230), wobei durch Umklonierung aus pBluescript mehrere Restriktionschnittstellen zwischen Promotor und Terminator zur Verfügung stehen. Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nicht-codierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisier-ten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz:

5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCCGGATCTGCTGGCTATGAA-3') . Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/SalI nachgeschnitten und in den Vektor pBinAR eingesetzt. Es entsteht das Plasmid mit der Bezeichnung pBinUSP.

5

Das Konstrukt wird zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* und Rapspflanzen eingesetzt.

- Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und
- 10 Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf D6-Acetylenase/Desaturase -Expression mittels Lipid-
- 15 fettsäuren oder Doppelbindungen an der delta-6-position werden identifiziert. Es läßt sich in den stabil transformierten trans-
- 20 pflanzen feststellen. genen Linien, die das Transgen funktionell exprimieren, ein erhöhter Gehalt von Acetylenfettsäuren und Doppelbindungen an der delta-6-position im Vergleich zu untransformierten Kontroll-

Beispiel 11:

Lipidextraktion aus Samen

25

Die Analyse von Lipiden aus Pflanzensamen verläuft analog der Analyse von Hefelipiden. Jedoch wird Pflanzenmaterial zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglich zu machen.

30

35

40

45

Tab. 1

Fatty acids	pYES2				Cer1/pYES2				Cer3/pYES2						
[mol %]	18:2	$\gamma$ -18:3	$\alpha$ -18:3	18:4	18:2	$\gamma$ -18:3	$\alpha$ -18:3	18:4	18:2	$\gamma$ -18:3	$\alpha$ -18:3	18:4			
16:0	26.2	24.1	27.8	27.4	32.7	24.2	23.1	26.2	25.7	26.5	26.5	23.3	28.1	29.2	29.6
16:1 <sup>9</sup>	41.8	9.6	27.4	27.3	16.1	36.5	13.3	24.7	28.8	21.9	43.8	9.9	25.2	34.0	20.9
16:2 <sup>6,9</sup>						6.9	1.8	3.3	5.3	3.0	1.1		0.1	0.8	0.1
18:0	6.5	5.3	6.1	6.1	7.9	6.4	6.1	6.6	6.5	7.1	5.5	5.3	6.3	5.8	5.9
18:1 <sup>9</sup>	23.6	4.9	15.1	14.8	11.3	24.9	8.8	15.6	20.0	16.8	21.4	5.3	15.7	14.3	11.5
18:2 <sup>6,9</sup>						0.3		0.2	0.3	0.2	0.1			0.1	
18:2 <sup>9,12</sup>	53.9					41.9					42.3				
18:3 <sup>6,9,12</sup>			19.5			0.8		16.1			8.1		21.2		
18:3 <sup>9,12,15</sup>			22.8						10.0					11.9	
18:4 <sup>6,9,12,15</sup>					28.8				1.7	21.3				1.9	30.1
18:3 <sup>6yn,9,12</sup>						1.3		4.6							
18:4 <sup>6yn,9,12,15</sup>									2.3						
$\Sigma$ Des. [mol %]	-	-	-	-	-	7.2	3.9	8.1	7.3	5.5	1.2	8.1	0.1	2.8	0.1

## Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit  
5  $\Delta 6$ -Acetylenase- und/oder  $\Delta 6$ -Desaturaseaktivität codiert,  
ausgewählt aus der Gruppe:
  - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1,  
SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,  
10
  - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degene-  
rierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1,  
SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nuklein-  
säuresequenz ableiten,  
15
  - c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder  
SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für  
Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Amino-  
säuresequenzen codieren und mindestens 75 % Homologie auf  
20 Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische  
Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz  
gemäß Anspruch 1.  
25
3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in  
SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellte  
Sequenz.
- 30 4. Expressionskassette enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß  
Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder  
mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1  
35 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
6. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz ge-  
mäß Anspruch 1 oder mindestens ein Expressionskassette gemäß  
Anspruch 4 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 5.  
40
7. Organismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Organismus  
um eine Pflanze, einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.

8. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eine funktionelle oder nicht funktionelle Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
- 5
9. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden
- 10 Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
10. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
- 15
- 20
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die ungesättigten Fettsäuren einen erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren mit einer Dreifachbindung oder mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position oder einer Dreifachbindung und Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position aufweisen.
- 25
12. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder einen Mikroorganismus handelt.
- 30
13. Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 8 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 35
14. Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 10 dargestellte Aminosäuresequenz.
15. Verwendung von Proteinen nach Anspruch 13 oder 14 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren.
- 40
16. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, indem man Triglyceride mit gesättigten oder ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit mindestens einem der Proteine gemäß Anspruch 2, 13 oder 14 inkubiert.
- 45

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Triglyceride in Gegenwart einer Verbindung hergestellt werden, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.
- 5 18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.
19. Ungesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 18.
- 10 20. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 10, 16 oder 17.
- 15 21. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
- 20 22. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer genomischen Sequenz über Homologiescreening.
- 25 23. Verwendung von ungesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 19 oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten gemäß Anspruch 20 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika.

30

35

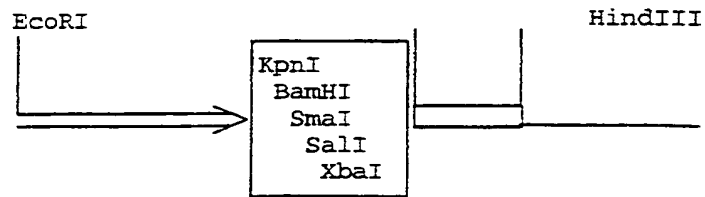
40

45

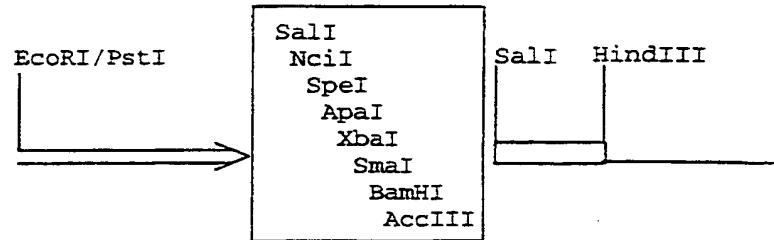


Fig. 1: Aufbau von Expressionskassetten

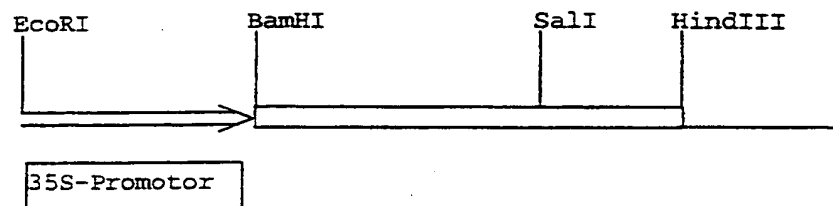
## A) pBinAR



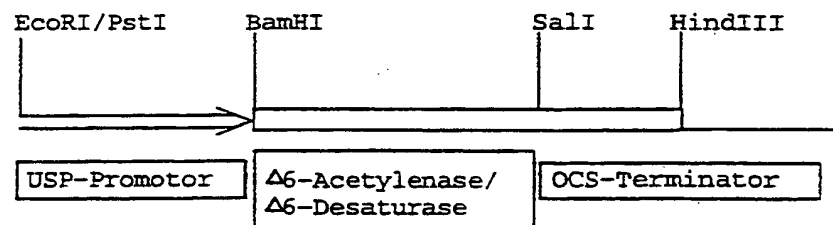
## B) pBinUSP



## C) pBinARI



## D) pBIN-USP Cer1



USP = unbekanntes Samenprotein

35S = Promotor aus Blumenkohl-Terminator

OCS = Octopin Synthase Terminator

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> D6-Acetylenase und D6-Desaturase aus Ceratodon  
purpureus

<130> 99 1388

<140>

<141>

<150> 19925718.3

<151> 1999-06-07

<160> 12

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2040

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

<220>

<221> CDS

<222> (176)..(1627)

<400> 1

```
ctcaggcagg tctcagttga tgagacgctg agttctgaat cctttgagct gtgtcaggct 60
eggcacttgt gggatggtga aggagtgatc gatcaggagt gcaggagctg cattagtttc 120
tcagggtcga tcaggttatt ctgaaaaagg ctgcgtctgt gagcagtttg caaaa atg 178
Met
1

gcc ctc gtt acc gac ttt ctg aac ttt ctg ggc acg aca tgg agc aag 226
Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser Lys
5 10 15

tac agc gtg tac acc cat agc tat gct gga aac tat ggg cct act ttg 274
Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr Leu
20 25 30

aag cac gcc aaa aag gtt tct gct caa ggt aaa act gcg gga cag aca 322
Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln Thr
35 40 45

ctg aga cag aga tcg gtg cag gac aaa aag cca ggc act tac tct ctg 370
Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser Leu
```

50	55	60	65	
gcc gat gtt gct tct cac gac agg cct gga gac tgc tgg atg atc gtc				418
Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile Val				
	70	75	80	
aaa gag aag gtg tat gat att agc cgt ttt gcg gac gac cac cct gga				466
Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro Gly				
	85	90	95	
ggg acg gta att agc acc tac ttt ggg cgg gat ggc aca gac gtt ttc				514
Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe				
	100	105	110	
gca aca ttc cat cca cct gcc gca tgg aag caa ctc aat gac tac tac				562
Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr Tyr				
	115	120	125	
att gga gac ctt gct agg gaa gag ccc ctt gat gaa ttg ctt aaa gac				610
Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys Asp				
	130	135	140	145
tac aga gat atg aga gcc gag ttt gtt aga gaa ggg ctt ttc aag agt				658
Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys Ser				
	150	155	160	
tcc aag gcc tgg ttc ctg ctt cag act ctg att aat gca gct ctc ttt				706
Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu Phe				
	165	170	175	
gct gcg agc att gcg act atc tgt tac gac aag agt tac tgg gct att				754
Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala Ile				
	180	185	190	
gtg ctg tca gcc agt ttg atg ggt ctc ttc gtc caa cag tgt gga tgg				802
Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly Trp				
	195	200	205	
ctt gcc cat gat ttc ctt cat caa cag gtc ttt gag aac cgt acc gcg				850
Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr Ala				
	210	215	220	225
aac tcc ttc ttt ggc tat ttg ttc ggc aat tgc gtg ctt ggc ttt agt				898
Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe Ser				
	230	235	240	
gta tca tgg tgg agg acg aag cac aac att cat cat act gct ccg aat				946
Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro Asn				
	245	250	255	
gag tgc gac gaa cag tac aca cct cta gac gaa gac att gat act ctc				994

Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu	
260	270
ccc atc att gcc tgg agc aag gaa att ttg gcc acc gtt gag agc aag	1042
Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys	
275	285
aga att ttg cga gtg ctt caa tat cag cac tac atg att ctg cct cta	1090
Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro Leu	
290	305
ttg ttc atg gcc cgg tac agt tgg act ttt gga agt ttg ctc ttc aca	1138
Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe Thr	
310	320
ttc aat cct gat ttg agc acg acc aag gga ttg ata gag aag gga aca	1186
Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly Thr	
325	335
gtt gct ttt cac tac gcc tgg ttc agt tgg gct gcg ttc cat att ttg	1234
Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile Leu	
340	350
ccg ggt gtc gct aag cct ctt gcg tgg atg gta gca act gag ctt gtg	1282
Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu Val	
355	365
gcc ggt ttg ttg ttg gga ttc gtg ttt acg ttg agt cac aat gga aag	1330
Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly Lys	
370	385
gag gtt tac aat gaa tcg aag gac ttc gtg aga gcc cag gtt att acc	1378
Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile Thr	
390	400
acc cgt aac acc aag cga ggc tgg ttc aac gat tgg ttc act ggg gga	1426
Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly	
405	415
ctc gac acc cag att gag cat cac ctg ttt cca aca atg ccc agg cac	1474
Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His	
420	430
aac tac ccc aag atc gca cct cag gtc gag gct ctt tgc aag aag cac	1522
Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys His	
435	445
ggc ctc gag tac gat aat gtc tcc gtc gtt ggt gcc tct gtc gcg gtt	1570
Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala Val	
450	465

gtg aag gcg ctc aag gaa att gct gat gaa gcg tca att cgg ctt cac 1618  
 Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu His  
                   470                                  475                                  480

gct cac taa gaaatcgctg aactttgact attcattttt ttcgcctggc 1667  
 Ala His

tacctcaaat gttcgggagc aggtgcttgg cagtgtgttc aaccggagcg cactgaaaat 1727

gtgcagaatc catttccaga aattaccatt cctagctaaa tcttcttttt accaggtcgg 1787

atatatgaaa cttttttgat gcaacaagta gcattcaatt gaagacattg ttcgagatat 1847

aattcgcagt gtttctattc agcggggcata cgtactagtc catatcggcg gttgccgaga 1907

gtttacatta ttagttggca caacgagtag atctagtgtg aatttctatt tccgcatgta 1967

atattactct gaatatatac cgttatctat tttcctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2027

aaaaaaaaaa aaa 2040

<210> 2

<211> 483

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 2

Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser  
   1                  5                                  10                                  15

Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr  
                   20                                  25                                  30

Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln  
                   35                                  40                                  45

Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser  
                   50                                  55                                  60

Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile  
   65                                  70                                  75                                  80

Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro  
                   85                                  90                                  95

Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val  
                   100                                  105                                  110

Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr  
                   115                                  120                                  125

Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys  
 130 135 140

Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys  
 145 150 155 160

Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu  
 165 170 175

Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala  
 180 185 190

Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly  
 195 200 205

Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr  
 210 215 220

Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe  
 225 230 235 240

Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro  
 245 250 255

Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile Asp Thr  
 260 265 270

Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser  
 275 280 285

Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro  
 290 295 300

Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe  
 305 310 315 320

Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly  
 325 330 335

Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile  
 340 345 350

Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu  
 355 360 365

Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly  
 370 375 380

Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile  
 385 390 395 400

Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly  
 405 410 415  
 Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg  
 420 425 430  
 His Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys  
 435 440 445  
 His Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala  
 450 455 460  
 Val Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu  
 465 470 475 480  
 His Ala His

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1467

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Ceratodon purpureus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (10)..(1461)

&lt;400&gt; 3

ggatccaaa atg gcc ctc gtt acc gac ttt ctg aac ttt ctg ggc acg aca 51

Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr

1

5

10

tgg agc aag tac agc gtg tac acc cat agc tat gct gga aac tat ggg 99

Trp Ser Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly

15

20

25

30

cct act ttg aag cac gcc aaa aag gtt tct gct caa ggt aaa act gcg 147

Pro Thr Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala

35

40

45

gga cag aca ctg aga cag aga tcg gtg cag gac aaa aag cca ggc act 195

Gly Gln Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr

50

55

60

tac tct ctg gcc gat gtt gct tct cac gac agg cct gga gac tgc tgg 243

Tyr Ser Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp

65

70

75

atg atc gtc aaa gag aag gtg tat gat att agc cgt ttt gcg gac gac 291

Met Ile Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp

80	85	90	
cac cct gga ggg acg gta att agc acc tac ttt ggg cgg gat ggc aca			339
His Pro Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr			
95	100	105	110
gac gtt ttc gca aca ttc cat cca cct gcc gca tgg aag caa ctc aat			387
Asp Val Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn			
	115	120	125
gac tac tac att gga gac ctt gct agg gaa gag ccc ctt gat gaa ttg			435
Asp Tyr Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu			
	130	135	140
ctt aaa gac tac aga gat atg aga gcc gag ttt gtt aga gaa ggg ctt			483
Leu Lys Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu			
	145	150	155
ttc aag agt tcc aag gcc tgg ttc ctg ctt cag act ctg att aat gca			531
Phe Lys Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala			
	160	165	170
gct ctc ttt gct gcg agc att gcg act atc tgt tac gac aag agt tac			579
Ala Leu Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr			
175	180	185	190
tgg gct att gtg ctg tca gcc agt ttg atg ggt ctc ttc gtc caa cag			627
Trp Ala Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln			
	195	200	205
tgt gga tgg ctt gcc cat gat ttc ctt cat caa cag gtc ttt gag aac			675
Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn			
	210	215	220
cgt acc gcg aac tcc ttc ttt ggc tat ttg ttc ggc aat tgc gtg ctt			723
Arg Thr Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu			
	225	230	235
ggc ttt agt gta tca tgg tgg agg acg aag cac aac att cat cat act			771
Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr			
	240	245	250
gct ccg aat gag tgc gac gaa cag tac aca cct cta gac gaa gac att			819
Ala Pro Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile			
255	260	265	270
gat act ctc ccc atc att gcc tgg agc aag gaa att ttg gcc acc gtt			867
Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val			
	275	280	285
gag agc aag aga att ttg cga gtg ctt caa tat cag cac tac atg att			915



Glu Ser Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile	
290 295 300	
ctg cct cta ttg ttc atg gcc cgg tac agt tgg act ttt gga agt ttg	963
Leu Pro Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu	
305 310 315	
ctc ttc aca ttc aat cct gat ttg agc acg acc aag gga ttg ata gag	1011
Leu Phe Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu	
320 325 330	
aag gga aca gtt gct ttt cac tac gcc tgg ttc agt tgg gct gcg ttc	1059
Lys Gly Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe	
335 340 345 350	
cat att ttg ccg ggt gtc gct aag cct ctt gcg tgg atg gta gca act	1107
His Ile Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr	
355 360 365	
gag ctt gtg gcc ggt ttg ttg ttg gga ttc gtg ttt acg ttg agt cac	1155
Glu Leu Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His	
370 375 380	
aat gga aag gag gtt tac aat gaa tcg aag gac ttc gtg aga gcc cag	1203
Asn Gly Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln	
385 390 395	
gtt att acc acc cgt aac acc aag cga ggc tgg ttc aac gat tgg ttc	1251
Val Ile Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe	
400 405 410	
act ggg gga ctc gac acc cag att gag cat cac ctg ttt cca aca atg	1299
Thr Gly Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met	
415 420 425 430	
ccc agg cac aac tac ccc aag atc gca cct cag gtc gag gct ctt tgc	1347
Pro Arg His Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys	
435 440 445	
aag aag cac ggc ctc gag tac gat aat gtc tcc gtc gtt ggt gcc tct	1395
Lys Lys His Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser	
450 455 460	
gtc gcg gtt gtg aag gcg ctc aag gaa att gct gat gaa gcg tca att	1443
Val Ala Val Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile	
465 470 475	
cgg ctt cac gct cac taa gtcgac	1467
Arg Leu His Ala His	
480	

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 483

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Ceratodon purpureus

&lt;400&gt; 4

Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser  
 1 5 10 15

Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr  
 20 25 30

Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln  
 35 40 45

Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile  
 65 70 75 80

Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro  
 85 90 95

Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val  
 100 105 110

Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr  
 115 120 125

Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys  
 130 135 140

Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys  
 145 150 155 160

Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu  
 165 170 175

Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala  
 180 185 190

Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly  
 195 200 205

Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr  
 210 215 220

Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe  
 225 230 235 240

Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro  
 245 250 255  
 Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile Asp Thr  
 260 265 270  
 Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser  
 275 280 285  
 Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro  
 290 295 300  
 Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe  
 305 310 315 320  
 Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly  
 325 330 335  
 Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile  
 340 345 350  
 Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu  
 355 360 365  
 Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly  
 370 375 380  
 Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile  
 385 390 395 400  
 Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly  
 405 410 415  
 Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg  
 420 425 430  
 His Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys  
 435 440 445  
 His Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala  
 450 455 460  
 Val Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu  
 465 470 475 480  
 His Ala His

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 520

&lt;212&gt; DNA

<213> *Ceratodon purpureus*

&lt;400&gt; 5

cattcatcat actgctccga atgagtgcga cgaacagtag acacctctag acgaagacat 60  
tgatactctc cccatcattg cctggagcaa ggaaattttg gccaccgttg agagcaagag 120  
aattttgcga gtgcttcgat atcagcacta catgattctg cctctattgt tcatggccccg 180  
gtacagttgg acttttggaa gtttgctctt cacattcaat cctgatttga gcacgaccaa 240  
gggattgata gagaagggaa cagttgcttt tcactacgcc tggttcagtt gggctgcggt 300  
ccatattttg ccgggtgtcg ctaagcctct tgcgtggatg gtagcaactg agcttgtggc 360  
cggtttggtg ttgggattcg tgtttacgtt gagtcaaat ggaaaggagg ttacaaatga 420  
atcgaaggac ttcgtgagag ccaggttat taccaccgt aacaccaagc gaggctgggt 480  
caacgattgg ttactgggg gactcgacac ccagattgag 520

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 173

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ceratodon purpureus*

&lt;400&gt; 6

Ile His His Thr Ala Pro Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu  
1 5 10 15  
Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile  
20 25 30  
Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln  
35 40 45  
His Tyr Met Ile Leu Pro Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr  
50 55 60  
Phe Gly Ser Leu Leu Phe Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys  
65 70 75 80  
Gly Leu Ile Glu Lys Gly Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser  
85 90 95  
Trp Ala Ala Phe His Ile Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp  
100 105 110  
Met Val Ala Thr Glu Leu Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe

115	120	125
Thr Leu Ser His Asn Gly Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe		
130	135	140
Val Arg Ala Gln Val Ile Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe		
145	150	155
		160
Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu		
165	170	

<210> 7  
 <211> 514  
 <212> DNA  
 <213> *Ceratodon purpureus*

<400> 7  
 cctgcatcat gctgctccga atgaatgcga ccaaagtagc acgccgattg atgaggatat 60  
 tgatactctc cccatcattg cttggagtaa agatctcttg gccactgttg agagcaagac 120  
 catgttgcca gttcttcagt accagcacct attctttttg gttcttttga cgtttgcccg 180  
 ggcgagttgg ctattttgga gcgcggcctt cactctcagg cccgagttga cccttgccga 240  
 gaagcttttg gagaggggaa cgatggcttt gcactacatt tggtttaata gtgttgcgtt 300  
 ttatctgctc cccggatgga aaccagttgt atggatggtg gtcagcgagc tcatgtctgg 360  
 tttctgctg ggatacgtat ttgtactcag tcacaatgga atggaggtgt acaatacgtc 420  
 aaaggacttc gtgaatgcc agattgcac gactcgcgac atcaaagcag ggggtgtttaa 480  
 tgattggttc accggaggtc tcaacagaca gatt 514

<210> 8  
 <211> 172  
 <212> PRT  
 <213> *Ceratodon purpureus*

<400> 8  
 Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile  
 1 5 10 15  
 Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu  
 20 25 30  
 Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln  
 35 40 45

His Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu  
 50 55 60

Phe Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu  
 65 70 75 80

Lys Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn  
 85 90 95

Ser Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met  
 100 105 110

Val Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val  
 115 120 125

Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val  
 130 135 140

Asn Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn  
 145 150 155 160

Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu  
 165 170

<210> 9

<211> 535

<212> DNA

<213> *Ceratodon purpureus*

<400> 9

tgctcatcac atcgctgta atagtataga atatgatcca gacctacagt acatccccct 60  
 ttttgcagtg acatcaaagc tcttctctaa cctctactcc tacttctatg aaagggttat 120  
 gccattcgat ggcgtagcac gctctctgat tgcctaccag cactggacgt tttatccaat 180  
 aatggctggt gctcgggtga acctctttgc ccaatccctt ctagtactga cctcgaagaa 240  
 gcatgtgcca gacaggtggc ttgagctcgg tgctatcggt ttcttctacc tgtggttctt 300  
 caccctcttg tcgtacctgc ccactgcacc ggagaggctt gctttcgtcc ttgtcagttt 360  
 tgcagtgaca gggatccagc atgtacagtt ttgcctgaac cacttctcat cgccggttta 420  
 tctaggacag ccgaagagca aggcttgggt tgaatctcaa gcacggggca ctctcaatct 480  
 ctctacaccg gcttacatgg attggtttca cgggggtctt cagttccaga tcgag 535

<210> 10  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Ceratodon purpureus  
  
 <400> 10  
 Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Ile Glu Tyr Asp Pro Asp Leu Gln  
   1                  5                  10                  15  
  
 Tyr Ile Pro Leu Phe Ala Val Thr Ser Lys Leu Phe Ser Asn Leu Tyr  
           20                  25                  30  
  
 Ser Tyr Phe Tyr Glu Arg Val Met Pro Phe Asp Gly Val Ala Arg Ser  
       35                  40                  45  
  
 Leu Ile Ala Tyr Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro Ile Met Ala Val Ala  
   50                  55                  60  
  
 Arg Val Asn Leu Phe Ala Gln Ser Leu Leu Val Leu Thr Ser Lys Lys  
   65                  70                  75                  80  
  
 His Val Pro Asp Arg Trp Leu Glu Leu Gly Ala Ile Gly Phe Phe Tyr  
                   85                  90                  95  
  
 Leu Trp Phe Phe Thr Leu Leu Ser Tyr Leu Pro Thr Ala Pro Glu Arg  
           100                  105                  110  
  
 Leu Ala Phe Val Leu Val Ser Phe Ala Val Thr Gly Ile Gln His Val  
       115                  120                  125  
  
 Gln Phe Cys Leu Asn His Phe Ser Ser Pro Val Tyr Leu Gly Gln Pro  
       130                  135                  140  
  
 Lys Ser Lys Ala Trp Val Glu Ser Gln Ala Arg Gly Thr Leu Asn Leu  
   145                  150                  155                  160  
  
 Ser Thr Pro Ala Tyr Met Asp Trp Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln  
           165                  170                  175  
  
 Ile Glu

<210> 11  
 <211> 2160  
 <212> DNA  
 <213> Ceratodon purpureus  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (159)..(1721)

<400> 11

cgagggtctc	ttgtcgttct	tggagtcgtg	gtcagacttg	gaatgcggta	ggcgcggccg	60										
tttcgtgggt	ttggcgttgg	cattgcgcga	gggcggacag	tgggagtgcg	ggaggtctgt	120										
ttgtgcatga	cgaggtgggt	gtaatcttcg	ccggcaga	atg	gtg	tcc	cag	ggc	ggc	176						
					Met	Val	Ser	Gln	Gly	Gly						
					1					5						
ggt	ctc	tcg	cag	ggt	tcc	att	gaa	gaa	aac	att	gac	gtt	gag	cac	ttg	224
Gly	Leu	Ser	Gln	Gly	Ser	Ile	Glu	Glu	Asn	Ile	Asp	Val	Glu	His	Leu	
			10						15						20	
gca	acg	atg	ccc	ctc	gtc	agt	gac	ttc	cta	aat	gtc	ctg	gga	acg	act	272
Ala	Thr	Met	Pro	Leu	Val	Ser	Asp	Phe	Leu	Asn	Val	Leu	Gly	Thr	Thr	
			25						30						35	
ttg	ggc	cag	tgg	agt	ctt	tcc	act	aca	ttc	gct	ttc	aag	agg	ctc	acg	320
Leu	Gly	Gln	Trp	Ser	Leu	Ser	Thr	Thr	Phe	Ala	Phe	Lys	Arg	Leu	Thr	
			40						45						50	
act	aag	aaa	cac	agt	tcg	gac	atc	tcg	gtg	gag	gca	caa	aaa	gaa	tcg	368
Thr	Lys	Lys	His	Ser	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Ala	Gln	Lys	Glu	Ser	
						60									70	
ggt	gcg	cgg	ggg	cca	gtt	gag	aat	att	tct	caa	tcg	gtt	gcg	cag	ccc	416
Val	Ala	Arg	Gly	Pro	Val	Glu	Asn	Ile	Ser	Gln	Ser	Val	Ala	Gln	Pro	
						75									85	
atc	agg	cgg	agg	tgg	gtg	cag	gat	aaa	aag	ccg	gtt	act	tac	agc	ctg	464
Ile	Arg	Arg	Arg	Trp	Val	Gln	Asp	Lys	Lys	Pro	Val	Thr	Tyr	Ser	Leu	
						90									100	
aag	gat	gta	gct	tcg	cac	gat	atg	ccc	cag	gac	tgc	tgg	att	ata	atc	512
Lys	Asp	Val	Ala	Ser	His	Asp	Met	Pro	Gln	Asp	Cys	Trp	Ile	Ile	Ile	
									110							
aaa	gag	aag	gtg	tat	gat	gtg	agc	acc	ttc	gct	gag	cag	cac	cct	gga	560
Lys	Glu	Lys	Val	Tyr	Asp	Val	Ser	Thr	Phe	Ala	Glu	Gln	His	Pro	Gly	
ggc	acg	gtt	atc	aac	acc	tac	ttc	gga	cga	gac	gcc	aca	gat	gtt	ttc	608
Gly	Thr	Val	Ile	Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Arg	Asp	Ala	Thr	Asp	Val	Phe	
tct	act	ttc	cac	gca	tcc	acc	tca	tgg	aag	att	ctt	cag	aat	ttc	tac	656
Ser	Thr	Phe	His	Ala	Ser	Thr	Ser	Trp	Lys	Ile	Leu	Gln	Asn	Phe	Tyr	
atc	ggg	aac	ctt	gtt	agg	gag	gag	ccg	act	ttg	gag	ctg	ctg	aag	gag	704



Ile Gly Asn Leu Val Arg Glu Glu Pro Thr Leu Glu Leu Leu Lys Glu	
170	175 180
tac aga gag ttg aga gcc ctt ttc ttg aga gaa cag ctt ttc aag agt	752
Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser	
185	190 195
tcc aaa tcc tac tac ctt ttc aag act ctc ata aat gtt tcc att gtt	800
Ser Lys Ser Tyr Tyr Leu Phe Lys Thr Leu Ile Asn Val Ser Ile Val	
200	205 210
gcc aca agc att gcg ata atc agt ctg tac aag tct tac cgg gcg gtt	848
Ala Thr Ser Ile Ala Ile Ile Ser Leu Tyr Lys Ser Tyr Arg Ala Val	
215	220 225 230
ctg tta tca gcc agt ttg atg ggc ttg ttt att caa cag tgc gga tgg	896
Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Ile Gln Gln Cys Gly Trp	
	235 240 245
ttg tct cac gat ttt cta cac cat cag gta ttt gag aca cgc tgg ctc	944
Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu	
	250 255 260
aat gac gtt gtt ggc tat gtg gtc ggc aac gtt gtt ctg gga ttc agt	992
Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn Val Val Leu Gly Phe Ser	
	265 270 275
gtc tcg tgg tgg aag acc aag cac aac ctg cat cat gct gct ccg aat	1040
Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn	
	280 285 290
gaa tgc gac caa aag tac aca ccg att gat gag gat att gat act ctc	1088
Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu	
295	300 305 310
ccc atc att gct tgg agt aaa gat ctc ttg gcc act gtt gag agc aag	1136
Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys	
	315 320 325
acc atg ttg cga gtt ctt cag tac cag cac cta ttc ttt ttg gtt ctt	1184
Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Leu Val Leu	
	330 335 340
ttg acg ttt gcc cgg gcg agt tgg cta ttt tgg agc gcg gcc ttc act	1232
Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe Trp Ser Ala Ala Phe Thr	
	345 350 355
ctc agg ccc gag ttg acc ctt ggc gag aag ctt ttg gag agg gga acg	1280
Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Arg Gly Thr	
	360 365 370

atg gct ttg cac tac att tgg ttt aat agt gtt gcg ttt tat ctg ctc 1328  
 Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser Val Ala Phe Tyr Leu Leu  
 375 380 385 390

ccc gga tgg aaa cca gtt gta tgg atg gtg gtc agc gag ctc atg tct 1376  
 Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val Val Ser Glu Leu Met Ser  
 395 400 405

ggt ttc ctg ctg gga tac gta ttt gta ctc agt cac aat gga atg gag 1424  
 Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu  
 410 415 420

gtg tac aat acg tca aag gac ttc gtg aat gcc cag att gca tcg act 1472  
 Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn Ala Gln Ile Ala Ser Thr  
 425 430 435

cgc gac atc aaa gca ggg gtg ttt aat gat tgg ttc acc gga ggt ctc 1520  
 Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu  
 440 445 450

aac aga cag att gag cat cat cta ttt cca acg atg ccc agg cac aac 1568  
 Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn  
 455 460 465 470

ctt aat aaa att tct cct cac gtg gag act ttg tgc aag aag cat gga 1616  
 Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr Leu Cys Lys Lys His Gly  
 475 480 485

ctg gtc tac gaa gac gtg agc atg gct tcg ggc act tac cgg gtt ttg 1664  
 Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Val Leu  
 490 495 500

aaa aca ctt aag gac gtt gcc gat gct gct tca cac cag cag ctt gct 1712  
 Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala Ser His Gln Gln Leu Ala  
 505 510 515

gcg agt tga ggcacgcag cactcgtcga aacatttttg tctgttatag 1761  
 Ala Ser  
 520

tgttcatatg tgatcgagg gaaaagggtcc catgctctga tctattcttc tgtagccaat 1821

atttttcaat tgaaaggagg ttctcactt atcttccatc tatcgttgca catcctgcat 1881

cagagttagc gttggagtaa tgtaagcac ttgtagatta tgcccacat tgccacattt 1941

ctgttcgggtt acaatcgttt gattccatgc tatectccgt gttcatctcg ttgttataag 2001

caagcttgaa aaaacatgct acgagattgg cagacgttgt cttggcagct gtagagggtg 2061

gttccattca ttgtgtagta cagaactctc tcgtccctgt ttctctacat tacttgttac 2121

atagtgcattt tcattcacag caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

2160

<210> 12

<211> 520

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 12

Met Val Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Gln Gly Ser Ile Glu Glu Asn  
1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Leu Ala Thr Met Pro Leu Val Ser Asp Phe Leu  
20 25 30

Asn Val Leu Gly Thr Thr Leu Gly Gln Trp Ser Leu Ser Thr Thr Phe  
35 40 45

Ala Phe Lys Arg Leu Thr Thr Lys Lys His Ser Ser Asp Ile Ser Val  
50 55 60

Glu Ala Gln Lys Glu Ser Val Ala Arg Gly Pro Val Glu Asn Ile Ser  
65 70 75 80

Gln Ser Val Ala Gln Pro Ile Arg Arg Arg Trp Val Gln Asp Lys Lys  
85 90 95

Pro Val Thr Tyr Ser Leu Lys Asp Val Ala Ser His Asp Met Pro Gln  
100 105 110

Asp Cys Trp Ile Ile Ile Lys Glu Lys Val Tyr Asp Val Ser Thr Phe  
115 120 125

Ala Glu Gln His Pro Gly Gly Thr Val Ile Asn Thr Tyr Phe Gly Arg  
130 135 140

Asp Ala Thr Asp Val Phe Ser Thr Phe His Ala Ser Thr Ser Trp Lys  
145 150 155 160

Ile Leu Gln Asn Phe Tyr Ile Gly Asn Leu Val Arg Glu Glu Pro Thr  
165 170 175

Leu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg  
180 185 190

Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Ser Tyr Tyr Leu Phe Lys Thr Leu  
195 200 205

Ile Asn Val Ser Ile Val Ala Thr Ser Ile Ala Ile Ile Ser Leu Tyr  
210 215 220

Lys Ser Tyr Arg Ala Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe  
 225 230 235 240  
 Ile Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val  
 245 250 255  
 Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn  
 260 265 270  
 Val Val Leu Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu  
 275 280 285  
 His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp  
 290 295 300  
 Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His  
 325 330 335  
 Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe  
 340 345 350  
 Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys  
 355 360 365  
 Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser  
 370 375 380  
 Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val  
 385 390 395 400  
 Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu  
 405 410 415  
 Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn  
 420 425 430  
 Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp  
 435 440 445  
 Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro  
 450 455 460  
 Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr  
 465 470 475 480  
 Leu Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser  
 485 490 495

Gly Thr Tyr Arg Val Leu Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala  
500 505 510

Ser His Gln Gln Leu Ala Ala Ser  
515 520



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No

PCT/EP 00/05274

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12N15/82 C12N1/19 C12P7/64  
 C12Q1/68 C11C1/00 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C12Q C11C A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) the whole document	19, 20
A	—	13
X	WO 96 21022 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 11 July 1996 (1996-07-11) cited in the application	19, 20
A	the whole document	1-18, 21-23
X	WO 97 37033 A (BAFOR MAUREEN ; BANAS ANTONI (PL); DAHLQVIST ANDERS (SE); GUMMESON) 9 October 1997 (1997-10-09) the whole document	19, 20
A	—	1-18, 21-23
	—	

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2000

Date of mailing of the international search report

20/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/05274

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 46764 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) claims	19,20
A		1-18, 21-23
A	GIRKE T ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL DELTA6-ACYL-GROUP DESATURASE BY TARGETED GENE DISRUPTION IN PHYSCOMITRELLA PATENS" PLANT JOURNAL, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, vol. 15, no. 1, 1998, pages 39-48, XP000881712 ISSN: 0960-7412 cited in the application the whole document	1-23
A	KOHN GERHARD ET AL: "Biosynthesis of acetylenic fatty acids in the moss Ceratodon purpureus (Hedw.) Brid." JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, vol. 144, no. 3, 1994, pages 265-271, XP000960337 ISSN: 0176-1617 page 269, column 2, paragraph 3 -page 270; figure 9	1-23
A	BEUTELMANN, PETER ET AL: "An uncommon pathway in the biosynthesis of acetylenic fatty acids in mosses" PLANT LIPID METAB., 'PAP. INT. MEET. PLANT LIPIDS!', 11TH (1995), MEETING DATE 1994, 546-8. EDITOR(S): KADER, JEAN-CLAUDE; MAZLIAK, PAUL. PUBLISHER: KLUWER, DORDRECHT, NETH. , XP000960428 the whole document	1-23
A	SPERLING PETRA ET AL: "A sphingolipid desaturase from higher plants: Identification of a new cytochrome b5 fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 44, 30 October 1998 (1998-10-30), pages 28590-28596, XP000882772 ISSN: 0021-9258 figure 1	14
	— -/-	



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Id. Application No.

PCT/EP 00/05274

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>SPERLING PETRA ET AL: "A bifunctional DELTA6-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss Ceratodon purpureus: A new member of the cytochrome b5 superfamily." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 267, no. 12, June 2000 (2000-06), pages 3801-3811, XP000960307 ISSN: 0014-2956 the whole document</p>	1-23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05274

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846763 A	22-10-1998	US 5968809 A	19-10-1999
		AU 6961698 A	11-11-1998
		AU 720677 B	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		BG 103797 A	28-04-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9808507 A	23-05-2000
		CN 1252099 T	03-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0975766 A	02-02-2000
		EP 0996732 A	03-05-2000
		NO 994925 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		PL 336077 A	05-06-2000
		PL 336143 A	05-06-2000
		WO 9846764 A	22-10-1998
WO 9621022 A	11-07-1996	US 5614393 A	25-03-1997
		AU 707061 B	01-07-1999
		AU 4673596 A	24-07-1996
		BR 9510411 A	19-05-1998
		CA 2207906 A	11-07-1996
		CN 1177379 A	25-03-1998
		EP 0801680 A	22-10-1997
		JP 10511848 T	17-11-1998
		US 5789220 A	04-08-1998
WO 9737033 A	09-10-1997	AU 720765 B	08-06-2000
		AU 1818797 A	22-10-1997
		CA 2250234 A	09-10-1997
		CZ 9803135 A	12-05-1999
		EP 0889970 A	13-01-1999
		JP 2000507450 T	20-06-2000
		NO 984448 A	30-11-1998
		PL 329175 A	15-03-1999
WO 9846764 A	22-10-1998	US 5972664 A	26-10-1999
		US 6075183 A	13-06-2000
		US 5968809 A	19-10-1999
		US 6051754 A	18-04-2000
		AU 720677 B	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		AU 720725 B	08-06-2000
		AU 7114898 A	11-11-1998
		BG 103796 A	31-05-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9809083 A	01-08-2000
		CN 1253587 T	17-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0996732 A	03-05-2000
		EP 1007691 A	14-06-2000
		NO 994924 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		PL 336067 A	05-06-2000
		PL 336077 A	05-06-2000
		WO 9846765 A	22-10-1998

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/EP 00/05274

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846764 A		AU 6961698 A	11-11-1998
		BG 103797 A	28-04-2000
		BR 9808507 A	23-05-2000
		CN 1252099 T	03-05-2000
		EP 0975766 A	02-02-2000
		NO 994925 A	30-11-1999
		PL 336143 A	05-06-2000
		WO 9846763 A	22-10-1998



# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Intr. Aktenzeichen

PCT/EP 00/05274

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12N15/82 C12N1/19 C12P7/64  
C12Q1/68 C11C1/00 A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P C12Q C11C A01H

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) das ganze Dokument	19, 20
A	—	13
X	WO 96 21022 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 11. Juli 1996 (1996-07-11) in der Anmeldung erwähnt	19, 20
A	das ganze Dokument	1-18, 21-23
X	WO 97 37033 A (BAFOR MAUREEN ; BANAS ANTONI (PL); DAHLQVIST ANDERS (SE); GUMMESON) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) das ganze Dokument	19, 20
A	—	1-18, 21-23
	—	—



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Researchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. November 2000

Absenddatum des internationalen Researchenberichts

20/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Researchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 46764 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) Ansprüche	19,20
A		1-18, 21-23
A	GIRKE T ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL DELTA6-ACYL-GROUP DESATURASE BY TARGETED GENE DISRUPTION IN PHYSCOMITRELLA PATENS" PLANT JOURNAL, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, Bd. 15, Nr. 1, 1998, Seiten 39-48, XP000881712 ISSN: 0960-7412 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-23
A	KOHN GERHARD ET AL: "Biosynthesis of acetylenic fatty acids in the moss Ceratodon purpureus (Hedw.) Brid." JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 144, Nr. 3, 1994, Seiten 265-271, XP000960337 ISSN: 0176-1617 Seite 269, Spalte 2, Absatz 3 -Seite 270; Abbildung 9	1-23
A	BEUTELMANN, PETER ET AL: "An uncommon pathway in the biosynthesis of acetylenic fatty acids in mosses" PLANT LIPID METAB., 'PAP. INT. MEET. PLANT LIPIDS!', 11TH (1995), MEETING DATE 1994, 546-8. EDITOR(S): KADER, JEAN-CLAUDE; MAZLIAK, PAUL. PUBLISHER: KLUWER, DORDRECHT, NETH. , XP000960428 das ganze Dokument	1-23
A	SPERLING PETRA ET AL: "A sphingolipid desaturase from higher plants: Identification of a new cytochrome b5 fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 273, Nr. 44, 30. Oktober 1998 (1998-10-30), Seiten 28590-28596, XP000882772 ISSN: 0021-9258 Abbildung 1	14
	— —/— —	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	SPERLING PETRA ET AL: "A bifunctional DELTA6-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss Ceratodon purpureus: A new member of the cytochrome b5 superfamily." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 267, Nr. 12, Juni 2000 (2000-06), Seiten 3801-3811, XP000960307 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument	1-23

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intr: ionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05274

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9846763 A	22-10-1998	US 5968809 A	19-10-1999
		AU 6961698 A	11-11-1998
		AU 720677 B	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		BG 103797 A	28-04-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9808507 A	23-05-2000
		CN 1252099 T	03-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0975766 A	02-02-2000
		EP 0996732 A	03-05-2000
		NO 994925 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		PL 336077 A	05-06-2000
		PL 336143 A	05-06-2000
		WO 9846764 A	22-10-1998
WO 9621022 A	11-07-1996	US 5614393 A	25-03-1997
		AU 707061 B	01-07-1999
		AU 4673596 A	24-07-1996
		BR 9510411 A	19-05-1998
		CA 2207906 A	11-07-1996
		CN 1177379 A	25-03-1998
		EP 0801680 A	22-10-1997
		JP 10511848 T	17-11-1998
		US 5789220 A	04-08-1998
WO 9737033 A	09-10-1997	AU 720765 B	08-06-2000
		AU 1818797 A	22-10-1997
		CA 2250234 A	09-10-1997
		CZ 9803135 A	12-05-1999
		EP 0889970 A	13-01-1999
		JP 2000507450 T	20-06-2000
		NO 984448 A	30-11-1998
		PL 329175 A	15-03-1999
WO 9846764 A	22-10-1998	US 5972664 A	26-10-1999
		US 6075183 A	13-06-2000
		US 5968809 A	19-10-1999
		US 6051754 A	18-04-2000
		AU 720677 B	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		AU 720725 B	08-06-2000
		AU 7114898 A	11-11-1998
		BG 103796 A	31-05-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9809083 A	01-08-2000
		CN 1253587 T	17-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0996732 A	03-05-2000
		EP 1007691 A	14-06-2000
		NO 994924 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		PL 336067 A	05-06-2000
		PL 336077 A	05-06-2000
		WO 9846765 A	22-10-1998



# INTERNATIONALER RECHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 00/05274

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9846764 A		AU 6961698 A	11-11-1998
		BG 103797 A	28-04-2000
		BR 9808507 A	23-05-2000
		CN 1252099 T	03-05-2000
		EP 0975766 A	02-02-2000
		NO 994925 A	30-11-1999
		PL 336143 A	05-06-2000
		WO 9846763 A	22-10-1998

